

PCT

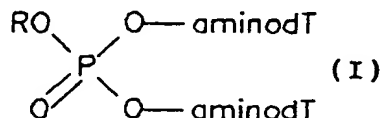
ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|---|-----------|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07H 21/00, A61K 31/70 | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 93/12131 (43) Date de publication internationale: 24 juin 1993 (24.06.93) |
| <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/01173</p> <p>(22) Date de dépôt international: 11 décembre 1992 (11.12.92)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 91/15421 12 décembre 1991 (12.12.91) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75007 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : IMBACH, Jean-Louis [FR/FR]; 1108, rue de la Sorbes, F-34080 Montpellier (FR). GOSSELIN, Gilles [FR/FR]; Résidence Barque-des-Arceaux, Bâtiment FE 1, 83, rue Calvin, F-34080 Montpellier (FR).</p> | | <p>(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p> |

(54) Title: 2',3'-DIDEOXY-3'-AMINOTHYIMIDINE DERIVATIVES, METHOD FOR PREPARING SAME, AND THERAPEUTICAL USES THEREOF

(54) Titre: DERIVES DE 2',3'-DIDESOXY-3'-AMINOTHYIMIDINE, LEUR PREPARATION ET LEUR APPLICATION EN THERAPEUTIQUE



(57) Abstract

2',3'-dideoxy-3'-amino-thymidine derivatives of formula (I), wherein R is NH_4^+ or $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_2$; and therapeutic uses thereof.

(57) Abrégé

Dérivés de 2',3'-didesoxy-3'-aminothymidine répondant à la formule (I) dans laquelle R est NH_4^+ ou $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_2$. Application thérapeutique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche | FR | France | MR | Mauritanie |
| AU | Australie | GA | Gabon | MW | Malawi |
| BB | Barbade | GB | Royaume-Uni | NL | Pays-Bas |
| BE | Belgique | GN | Guinée | NO | Norvège |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | PL | Pologne |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | PT | Portugal |
| BR | Brsil | IT | Italie | RO | Roumanie |
| CA | Canada | JP | Japon | RU | Fédération de Russie |
| CF | République Centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CG | Congo | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CH | Suisse | KZ | Kazakhstan | SK | République slovaque |
| CI | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SN | Sénégal |
| CM | Cameroon | LK | Sri Lanka | SU | Union soviétique |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CZ | République tchèque | MC | Monaco | TG | Togo |
| DE | Allemagne | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| DK | Danemark | ML | Malie | US | Etats-Unis d'Amérique |
| ES | Espagne | MN | Mongolie | VN | Viet Nam |
| FI | Finlande | | | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche | FR | France | MR | Mauritanie |
| AU | Australie | GA | Gabon | MW | Malawi |
| BB | Barbade | GB | Royaume-Uni | NL | Pays-Bas |
| BE | Belgique | GN | Guinée | NO | Norvège |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | PL | Pologne |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | PT | Portugal |
| BR | Brésil | IT | Italie | RO | Roumanie |
| CA | Canada | JP | Japon | RU | Fédération de Russie |
| CF | République Centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CG | Congo | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CH | Suisse | KZ | Kazakhstan | SK | République slovaque |
| CI | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SN | Sénégal |
| CM | Cameroon | LK | Sri Lanka | SU | Union soviétique |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CZ | République tchèque | MC | Monaco | TG | Togo |
| DE | Allemagne | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| DK | Danemark | ML | Malï | US | Etats-Unis d'Amérique |
| ES | Espagne | MN | Mongolie | VN | Viet Nam |
| FI | Finlande | | | | |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DERIVES DE 2',3'-DIDESOXY-3'-AMINOTHYIMIDINE,

LEUR PREPARATION ET LEUR APPLICATION EN THERAPEUTIQUE

La présente invention a pour objet des dérivés de
2',3'-didesoxy-3'-aminothymidine (ou amino-dT), leur

5 préparation et leur application en thérapeutique.

Les composés de l'invention répondent à la formule donnée en
annexe 1 dans laquelle

R est NH_4^+ ou $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_2\text{-}$.

La préparation des composés de l'invention est indiquée
10 ci-après.

Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur
plaques de silice Merck 60F 254 (art.5554). Les chromato-
graphies sur colonne de gel de silice ont été effectuées avec
de la silice Merck 60 H (art. 7736) ou avec de la silice
15 silanisée RP2 Merck (art. 7719).

Les analyses CLPH ont été effectuées sur colonne Waters
Radial-Pak (diam.: 8 mm, l : 100 mm) C_{18} de granulométrie
sphérique de 10 μm . Cette colonne est protégée par une préco-
lonne Guard-Pak. Le système CLHP est composé d'un injecteur
20 U_6K , de deux pompes M-6000 A, d'un programmeur M-720
(Waters), d'un détecteur UV multicanal Pye Unicam PU 4021 et
d'un centre de contrôle vidéo PU 4850 (Philipps). L'élution a
été réalisée avec une solution d'acétonitrile dans un tampon
d'acétate d'ammonium 0,1 M (pH 5,9) à un débit de 2 ml par
25 minute (TR temps de rétention).

Les purifications CLHP ont été effectuées sur colonne SFCC
Nucléosil (diam.: 19 mm, l : 150 mm) de granulométrie
sphérique de 10 μm . Le système CLHP est composé d'un injec-
teur U_6K , de deux pompes M-510 EF, d'un programmeur M-720,
30 d'un détecteur UV M-481 et d'un enregistreur Data Module 746
(Waters). L'élution est réalisée avec une solution d'acétoni-
trile dans l'eau à un débit de 6,25 ml par minute.

Avant analyse, purification CLHP ou lyophilisation, les
solutions ont été filtrées sur filtre Millex HV-4

35 (Millipore).

Les spectres UV ont été enregistrés sur un spectrophotomètre
UVIKON 810.

Les spectres de masse ont été pris sur un appareil JEOL JMS

DX 300 par la méthode d'ionisation FAB dans une matrice de glycérol (G), glycérol/thioglycérol (GT) ou d'alcool 3-nitrobenzylique (NBA).

Les spectres RMN du proton ont été enregistrés sur un
5 appareil Varian EM 360 ou sur appareil Brüker AC 250.

Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS).

La multiplicité et l'allure des signaux observés par RMN sont indiquées par une (ou plusieurs) lettre(s) : s (singulet), d
10 (doublet), t (triplet), m (multiplet), l (large).

Les spectres RMN du phosphore ont été enregistrés sur un appareil Brüker WP 200 SY avec découplage du proton.

Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au signal de H_3PO_4 pris comme référence externe.

15

5'-O-Tertiobutyldiméthylsilyl 3'-amino 2',3'-didésoxythymidine 2.

A une solution de 8,35 g (34,6 mmol.) de 3'-amino-2',3'-di-
20 désoxythymidine 1 dans 250 ml de pyridine sont ajoutés 6,26 g (41,5 mmol.) de chlorure de tertiobutyldiméthylsilyle. La réaction est laissée 24 h. Le mélange est dilué avec du CH_2Cl_2 , lavé avec une solution aqueuse de $NaHCO_3$ puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et concentrée.
25 L'huile obtenue est chromatographiée sur gel de silice (éluant MeOH (0-10%) dans CH_2Cl_2) pour conduire à 11,8 g (96%) de 2 sous forme de mousse.

2UV (EtOH) : max 266 nm (ϵ 10600)

30 min 233 nm (ϵ 1700)

SM (FAB positif, GT) : 711 $(2M+H)^+$, 356 $(M+H)^+$, 127 $(BH_2)^+$

RMN¹H (DMSO- d_6) : δ = 0,07 (s, 6H, $(CH_3)_2Si$) ; 0,88 (s, 9H, $(CH_3)_3CSi$) ; 1,77 (s, 3H, CH_3) ; 2,03 (m, 2H, H-2',2'') ; 3,38 (m, 1H, H-3') ; 3,58 (m, 1H, H-4') ; 3,72 (dd, 1H, H-5', J =
35 3,9 et 10,4 Hz) ; 3,83 (dd, 1H, H-5'', J = 2,8 et 10,4 Hz) ; 6,11 (t, 1H, H-1', J = 6,2 Hz), 7,48 (s, 1H, H-6) ppm.

5'-O-Tertiobutyldiméthylsilyl 3'-(N-(4-méthoxytrityl)-amino)

DX 300 par la méthode d'ionisation FAB dans une matrice de glycérol (G), glycérol/thioglycérol (GT) ou d'alcool 3-nitrobenzylique (NBA).

Les spectres RMN du proton ont été enregistrés sur un
5 appareil Varian EM 360 ou sur appareil Brüker AC 250.

Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS).

La multiplicité et l'allure des signaux observés par RMN sont indiquées par une (ou plusieurs) lettre(s) : s (singulet), d
10 (doublet), t (triplet), m (multiplet), l (large).

Les spectres RMN du phosphore ont été enregistrés sur un appareil Brüker WP 200 SY avec découplage du proton.

Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au signal de H_3PO_4 pris comme référence externe.

15

5'-O-Tertiobutyldiméthylsilyl 3'-amino 2',3'-didésoxythymidine 2.

A une solution de 8,35 g (34,6 mmol.) de 3'-amino-2',3'-di-
20 désoxythymidine 1 dans 250 ml de pyridine sont ajoutés 6,26 g (41,5 mmol.) de chlorure de tertiobutyldiméthylsilyle. La réaction est laissée 24 h. Le mélange est dilué avec du CH_2Cl_2 , lavé avec une solution aqueuse de $NaHCO_3$ puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et concentrée.
25 L'huile obtenue est chromatographiée sur gel de silice (éluant MeOH (0-10%) dans CH_2Cl_2) pour conduire à 11,8 g (96%) de 2 sous forme de mousse.

2UV (EtOH) : max 266 nm (ϵ 10600)
30 min 233 nm (ϵ 1700)

SM (FAB positif, GT) : 711 $(2M+H)^+$, 356 $(M+H)^+$, 127 $(BH_2)^+$
RMN¹H (DMSO- d_6) : δ = 0,07 (s, 6H, $(CH_3)_2Si$) ; 0,88 (s, 9H, $(CH_3)_3CSi$) ; 1,77 (s, 3H, CH_3) ; 2,03 (m, 2H, H-2',2'') ; 3,38 (m, 1H, H-3') ; 3,58 (m, 1H, H-4') ; 3,72 (dd, 1H, H-5', J =
35 3,9 et 10,4 Hz) ; 3,83 (dd, 1H, H-5'', J = 2,8 et 10,4 Hz) ; 6,11 (t, 1H, H-1', J = 6,2 Hz), 7,48 (s, 1H, H-6) ppm.

5'-O-Tertiobutyldiméthylsilyl 3'-(N-(4-méthoxytrityl)-amino)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2',3'-didésoxythymidine 3.

Le composé 2 (11,7 g ; 32,9 mmol.) est traité par 15,2 g (49,2 mmol.) de chlorure de 4-méthoxytrityle dans 295 ml de pyridine durant 20 h. Le mélange est repris avec du CH₂Cl₂ (1% Et₃N), lavé avec une solution aqueuse de NaHCO₃ puis à l'eau. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, évaporée et coévaporée avec du toluène. Une purification sur colonne de gel de silice (éluant : MeOH (0-3%), Et₃N (1%) dans CH₂Cl₂) conduit à 17,5 g (85%) de 3 sous forme de mousse.

10

3UV (EtOH) : λ max 266 nm (ϵ 11300)

λ min 254 nm (ϵ 10200)

λ inflex 232 nm (ϵ 15800)

15 SM (FAB positif, GT) : 628 (M+H)⁺, 127 (BH₂)⁺

RMN¹H (DMSO-d₆) : δ = -0,08 et -0,04 (s et s, 3H et 3H,

(CH₃)₂Si) ; 0,79 (s, 9H, (CH₃)₃CSi) ; 1,10-1,37 (m, 2H,

H-2',2'') ; 1,69 (s, 3H, CH₃) ; 3,17 (m, 1H, H-3') ; 3,50 (m,

2H, H-4', NH) ; 3,70 (m, 1H, H-5') ; 3,71 (s, 3H, CH₃OTr) ;

20 3,85 (m, 1H, H-5'') ; 6,09 (t, 1H, H-1' ; J = 6,9 Hz) ;

6,82-7,47 (m, 14H, Tr), 7,20 (s, 1H, H-6) ppm.

3'-(N-(4-Méthoxytrityl)-amino) 2',3'-didésoxythymidine 4.

Le traitement de 17,4 g (27,7 mmol.) de 3 par 83 ml (91 mmol.) d'une solution 1,1 M de fluorure de tétrabutylammonium dans le THF conduit à 10,2 g (72%) de 4 après évaporation du solvant et 4 chromatographies sur colonne de gel de silice (éluant : MeOH (0-15%), Et₃N (0,5%) dans CH₂Cl₂) pour chasser les sels de butylammonium.

30

4UV (EtOH) : λ max 265 nm (ϵ 9900)

λ min 255 nm (ϵ 8600)

λ inflex 231 nm (ϵ 14000)

SM (FAB positif, GT) : 514 (M+H)⁺, 127 (BH₂)⁺

35 RMN¹H (DMSO-d₆) : δ = 1,02-1,19 (m, 1H, H-2') ; 1,19-1,37 (m,

1H, H-2'') ; 1,68 (s, 3H, CH₃) ; 2,8 (sl, 1H, NH) ; 3,19 (m,

1H, H-3') ; 3,44 (m, 1H, H-5') ; 3,64 (m, 1H, H-5'') ; 3,71

(s, 3H, CH₃O) ; 3,72 (m, 1H, H-4') ; 4,90 (t, 1H, OH, J = 4,8

Hz) ; 5,97 (t, 1H, H-1', J = 6,5 Hz) ; 6,81-7,55 (m, 14H,

Tr) ; 7,55 (s, 1H, H-6) ; 11,2 (sl, 1H, NHCO) ppm.

O-(3'-(N-(4-méthoxytrityl)-amino) 2',3'-didésoxy-
5 thymidin-5'-yl)-hydrogénophosphate 5.

Une solution de 6,65 g (97,7 mmol.) d'imidazole dans 69 ml d'acétonitrile est traitée à 0°C par 2,60 ml (29,8 mmol.) de trichlorure de phosphore et 15,3 ml (110 mmol.) de triéthylamine durant 30'. Ce mélange est additionné à 5,12 g (9,99 mmol.) de 4 dans 69 ml d'acétonitrile. La phosphorylation est laissée 7 h puis 5 ml d'eau sont additionnés. La solution est alors concentrée sous pression réduite, reprise avec une solution de bicarbonate de triéthylammonium et extraite avec du CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice (éluant : MeOH (0-20%), Et₃N (0,05%) dans CH₂Cl₂) pour conduire à 5,1 g (75%) de 5.

5UV (EtOH) : λ max 265 nm (ϵ 8700)

20 λ min 254 nm (ϵ 7600)

λ inflex 231 nm (ϵ 12300)

SM (FAB négatif, GT) : 576 (M)⁻

RMN¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 1,00-1,50 (m, 2H, H-2',2''), 1,18 (t, 9H, (CH₃CH₂)₃N, J = 7,3 Hz) ; 1,75 (s, 3H, CH₃) ; 3,04 (quadruplet, 6H, (CH₃CH₂)₃N, J = 7,3 Hz), 3,21 (m, 1H, H-3') ; 3,60-3,95 (m, 3H, H-4',5',5'') ; 3,72 (s, 3H, CH₃OTr) ; 6,00 (t, 1H, H-1', J = 6,3 Hz) ; 6,61 (d, 1H, HP, J = 585 Hz) ; 6,80-7,55 (m, 14H, Tr) ; 7,66 (s, 1H, H-6) ; 10,5 (sl, 1H, NH) ; 10,8 (sl, 1H, NH) ppm

30 RMN³¹P (DMSO-*d*₆) : δ = 2,055 ppm.

O-O'-bis (3'-N-(4-méthoxytrityl)-amino) 2',3'-didésoxy-
thymidin-5'-yl)-phosphate 6.

35 Au mélange de 2,19 g (3,23 mmol.) d'hydrogénophosphate 5 et de 1,49 g (2,90 mmol.) du nucléoside 4 dans 42 ml de pyridine sont ajoutés 1,20 ml (9,74 mmol.) de chlorure de pivaloyle. Après 2 h de réaction, le milieu est dilué avec du CH₂Cl₂, lavé avec une solution aqueuse de NaHCO₃ puis à l'eau. La

Tr) ; 7,55 (s, 1H, H-6) ; 11,2 (sl, 1H, NHCO) ppm.

5 O-(3'-(N-(4-méthoxytrityl)-amino) 2',3'-didésoxy-
thymidin-5'-yl)-hydrogénophosphate 5.

Une solution de 6,65 g (97,7 mmol.) d'imidazole dans 69 ml d'acétonitrile est traitée à 0°C par 2,60 ml (29,8 mmol.) de trichlorure de phosphore et 15,3 ml (110 mmol.) de triéthylamine durant 30'. Ce mélange est additionné à 5,12 g (9,99 mmol.) de 4 dans 69 ml d'acétonitrile. La phosphorylation est laissée 7 h puis 5 ml d'eau sont additionnés. La solution est alors concentrée sous pression réduite, reprise avec une solution de bicarbonate de triéthylammonium et extraite avec du CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Le brut est purifié sur colonne de gel de silice (éluant : MeOH (0-20%), Et₃N (0,05%) dans CH₂Cl₂) pour conduire à 5,1 g (75%) de 5.

20 5UV (EtOH) : λ max 265 nm (ϵ 8700)

λ min 254 nm (ϵ 7600)

λ inflex 231 nm (ϵ 12300)

SM (FAB négatif, GT) : 576 (M)⁻

RMN¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 1,00-1,50 (m, 2H, H-2',2''), 1,18 (t, 9H, (CH₃CH₂)₃N, J = 7,3 Hz) ; 1,75 (s, 3H, CH₃) ; 3,04 (quadruplet, 6H, (CH₃CH₂)₃N, J = 7,3 Hz), 3,21 (m, 1H, H-3') ; 3,60-3,95 (m, 3H, H-4',5',5'') ; 3,72 (s, 3H, CH₃OTr) ; 6,00 (t, 1H, H-1', J = 6,3 Hz) ; 6,61 (d, 1H, HP, J = 585 Hz) ; 6,80-7,55 (m, 14H, Tr) ; 7,66 (s, 1H, H-6) ; 10,5 (sl, 1H, NH) ; 10,8 (sl, 1H, NH) ppm

30 RMN³¹P (DMSO-*d*₆) : δ = 2,055 ppm.

O-O'-bis (3'-N-(4-méthoxytrityl)-amino) 2',3'-didésoxy-
thymidin-5'-yl)-phosphate 6.

35 Au mélange de 2,19 g (3,23 mmol.) d'hydrogénophosphate 5 et de 1,49 g (2,90 mmol.) du nucléoside 4 dans 42 ml de pyridine sont ajoutés 1,20 ml (9,74 mmol.) de chlorure de pivaloyle. Après 2 h de réaction, le milieu est dilué avec du CH₂Cl₂, lavé avec une solution aqueuse de NaHCO₃ puis à l'eau. La

THIS PAGE BLANK (USPTO)

phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , concentrée et coévaporée avec du toluène. Le brut est repris avec 82 ml d'une solution d'iode à 2% dans le mélange pyridine, eau (98:2). Après 30', le milieu réactionnel est dilué avec du CH_2Cl_2 contenant 1% de Et_3N et avec une solution aqueuse de NaHCO_3 , puis est traité avec une solution aqueuse de thiosulfate de sodium jusqu'à disparition de la coloration due à l'iode. La phase organique est séparée, lavée avec de l'eau, séchée sur Na_2SO_4 , concentrée et coévaporée au toluène. Le diester 6 (2,27 g, 66%) est obtenu après chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : MeOH (0-10%), Et_3N (0,5%) dans CH_2Cl_2).

6UV (EtOH) : λ max 265 nm (ϵ 12300)
15 λ min 254 nm (ϵ 9200)
 λ inflex 231 nm (ϵ 15300)
SM (FAB négatif, GT) : 1088 (M)⁻; 816 (MH-MTr)⁻
RMN¹H (DMSO- d_6) : δ = 1,08-1,50 (m, 2H, H-2', 2'') ; 1,19 (t, 9H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$, J = 7,3 Hz) ; 1,75 (s, 3H, CH_3) ; 3,05
20 (quadruplet, 6H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$, J = 7,3 Hz) ; 3,20 (m, 1H, H-3') ; \approx 3,4 (m, H-4' masqué par l'eau) ; 3,70 (s, 3H, CH_3OTr) ; 3,78 (m, 2H, H-5', 5'') ; 6,04 (t, 1H, H-1', J = 6,1 Hz) ; 6,80-7,52 (m, 14H, Tr) ; 10,3 (sl, 1H, NH) ; 10,9 (sl, 1H, NH) ppm
25 RMN³¹P (DMSO- d_6) : δ = -1,126 ppm.

O,O'-bis(3'-amino-2',3'-didésoxythymidin-5'-yl) phosphate (sel d'ammonium) 7 (composé 1).

30 Le composé 6 (300 mg, 0,252 mmol.) est déprotégé par réaction avec 7,6 ml d'une solution à 2% d'acide benzène sulfonique dans le méthanol pendant 2 h. L'acide est neutralisé par addition d'une solution aqueuse de bicarbonate de triéthylammonium. La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2
35 puis concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est chromatographié 2 fois sur couche mince de gel de silice (éluant : ammoniacque (10%), eau (10%) dans l'isopropanol) pour conduire, après filtration sur filtre Millipore et lyophilisation dans l'eau, à 41 mg (31%) du diester 7 sous

forme de sel d'ammonium.

7CLHP : TR : 510 s (99, 4%) (5% CH₃CH/Ac ONH₄ 0,1M)

UV (H₂O) : λ max 266 nm (ϵ 15000)

5 λ min 235 nm (ϵ 4000)

SM (FAB négatif, GT) : 543 (M)⁻; (FAB positif, GT) : 589
(M+2Na)⁺, 567 (MH+Na)⁺, 545 (M+2H)⁺

10 RMN¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 1,77 (s, 6H, 2CH₃) ; 2,00-2,29 (m, 4H, 2H-2',2'') ; 3,46 (m, 2H, 2H-3') ; 3,70 (m, 2H, 2H-4') ; 3,92 (m, 4H, 2H-5',5'') ; 6,07 (t, 2H, 2H-1', J = 5,4 Hz) ; 7,64 (s, 2H, 2H-6) ppm
RMN³¹P (DMSO-*d*₆) : δ = -0,627 ppm.

- 15 O,O'-bis(3'-amino-2',3'-didésoxythymidin-5'-yl) O-(S-(2-hydroxyéthylsulfidyl) 2-thioéthyl) phosphate 8 (composé 2).
Un mélange de 300 mg (0,252 mmol.) de diester 6, de 315 mg (2,52 mmol.) de 4-méthoxyypyridine N-oxyde et de 1,07 g (2,51 mmol.) de O-mono-(4-méthoxytrityl) dithiodiéthanol (préparé
20 par réaction d'un grand excès de dithiodiéthanol avec du chlorure de 4-méthoxytrityle) en solution dans 63 ml de CH₂Cl₂ est traité avec 373 mg (1,26 mmol.) de 1-(2-mésitylène-sulfonyl) 3-nitro 1,2,4-triazole. Après 3 h de réaction, le milieu réactionnel est dilué avec du CH₂Cl₂, lavé avec une
25 solution aqueuse de NaHCO₃ puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, concentrée et coévaporée au toluène. Le brut est directement déprotégé par réaction avec 7,5 ml d'une solution à 2% d'acide benzène sulfonique dans le MeOH en 2 h. L'acide est neutralisé par addition d'une solu-
30 tion 1 M de bicarbonate de triéthylammonium. La phase aqueuse est lavée avec du CH₂Cl₂ et concentrée sous pression réduite. Le brut obtenu est purifié par CLHP semi préparative (colonne nucléosil C₁₈, éluant : 12% CH₃CN dans une solution 0,05 M d'acétate de triéthylammonium). Les fractions appropriées
35 sont évaporées et lyophilisées 4 fois dans l'eau. Après filtration, sur filtre Millipore, une dernière lyophilisation donne 50 mg (25%) de triester 8 associé à deux molécules d'acide acétique.

forme de sel d'ammonium.

7CLHP : TR : 510 s (99, 4%) (5% CH₃CH/Ac ONH₄ 0,1M)

UV (H₂O) : λ max 266 nm (ϵ 15000)

5 λ min 235 nm (ϵ 4000)

SM (FAB négatif, GT) : 543 (M)⁻; (FAB positif, GT) : 589

(M+2Na)⁺, 567 (MH+Na)⁺, 545 (M+2H)⁺

RMN¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 1,77 (s, 6H, 2CH₃) ; 2,00-2,29 (m, 4H,

2H-2', 2'') ; 3,46 (m, 2H, 2H-3') ; 3,70 (m, 2H, 2H-4') ; 3,92

10 (m, 4H, 2H-5', 5'') ; 6,07 (t, 2H, 2H-1', J = 5,4 Hz) ; 7,64

(s, 2H, 2H-6) ppm

RMN³¹P (DMSO-*d*₆) : δ = -0,627 ppm.

15 O,O'-bis(3'-amino-2',3'-didésoxythymidin-5'-yl) O-(S-(2-hydroxyéthylsulfidyl) 2-thioéthyl) phosphate 8 (composé 2).

Un mélange de 300 mg (0,252 mmol.) de diester 6, de 315 mg (2,52 mmol.) de 4-méthoxypyridine N-oxyde et de 1,07 g (2,51 mmol.) de O-mono-(4-méthoxytrityl) dithiodiéthanol (préparé

20 par réaction d'un grand excès de dithiodiéthanol avec du chlorure de 4-méthoxytrityle) en solution dans 63 ml de CH₂Cl₂ est traité avec 373 mg (1,26 mmol.) de 1-(2-mésitylène-sulfonyl) 3-nitro 1,2,4-triazole. Après 3 h de réaction, le milieu réactionnel est dilué avec du CH₂Cl₂, lavé avec une

25 solution aqueuse de NaHCO₃ puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, concentrée et coévaporée au toluène. Le brut est directement déprotégé par réaction avec 7,5 ml d'une solution à 2% d'acide benzène sulfonique dans le MeOH en 2 h. L'acide est neutralisé par addition d'une solu-

30 tion 1 M de bicarbonate de triéthylammonium. La phase aqueuse est lavée avec du CH₂Cl₂ et concentrée sous pression réduite.

Le brut obtenu est purifié par CLHP semi préparative (colonne nucléosil C₁₈, éluant : 12% CH₃CN dans une solution 0,05 M d'acétate de triéthylammonium). Les fractions appropriées

35 sont évaporées et lyophilisées 4 fois dans l'eau. Après filtration, sur filtre Millipore, une dernière lyophilisation donne 50 mg (25%) de triester 8 associé à deux molécules d'acide acétique.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BCLHP : TR 320s (94% ; 7 : 4%) (15% CH₃CN/AcONH₄ 0,1 M)

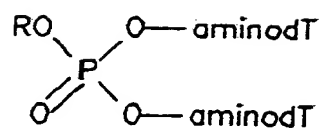
UV (H₂O) : λ max 265 nm (ϵ 15700)

λ min 234 nm (ϵ 4100)

SM (FAB positif, GT) : 681 (M+H)⁺, 545 (M-(OCH₂CH₂S)₂+ H)⁺

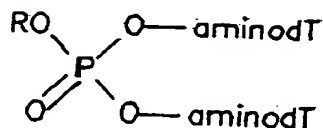
- 5 RMN¹H (DMSO-*d*₆) : δ = 1,78 (s, 6H, 2CH₃) ; 1,89 (s, 6H, 2CH₃COO⁻) ; 1,95-2,19 (m, 4H, 2H-2',2'') ; 2,77 (t, 2H, CH₂CH₂OH, J = 6,4 Hz) ; 2,96 (t, 2H, (CH₂CH₂OP, J = 6,5 Hz) ; 3,40 (m, 2H, 2H-3') ; 3,59 (t, 2H, (CH₂CH₂)OH, J = 6,4 Hz) ; 3,71 (m, 2H, 2H-4') ; 4,10-4,22 (m, 6H, 2H-5',5'', CH₂CH₂OP) ;
- 10 6,14 (dd, 2H, 2H-1', J = 5,7 et 6,7 Hz) ; 7,47 et 7,46 (s et s, 2H, 2H-6) ppm
- RMN³¹P (DMSO-*d*₆, D₂O) : δ = -0,504 ppm.

TABLEAU



| Composé | R |
|---------|--|
| 1 | NH_4^+ |
| 2 | $\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_2-$ |

TABLEAU



| Composé | R |
|---------|--|
| 1 | NH_4^+ |
| 2 | $\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_2-$ |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Les composés de l'invention ont été soumis à des essais pharmacologiques montrant leur intérêt dans le traitement de maladies virales.

5 - Evaluation de l'activité anti VIH 1 dans les cellules MT4

MT4 = cellule T humaine transformée par HTLV1

HTLV = human T lymphotropic virus.

La multiplication du VIH-1 (souche HTLV IIIB) dans les cellules MT4 est suivie par l'effet cytopathogène induit par le virus.

Les cellules sont infectées avec une dose de VIH-1 produisant après 5 jours une diminution de 90 % du nombre de cellules vivantes.

Les composés testés sont ajoutés, après l'adsorption du

virus, dans le milieu de culture à différentes concentrations. La concentration la plus élevée utilisée est 10^{-4} M. La viabilité des cellules est mesurée par une réaction colorimétrique basée sur leur capacité à réduire le bromure de 3-(4,5 diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényl-tetrazolium en formazan, propriété due aux déshydrogénases mitochondriales. La quantité de formazan produit est appréciée par la mesure de la D.O. à 540 nm : cette D.O. est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Le pourcentage de protection des cellules infectées par le traitement avec les composés est calculé en appliquant la formule proposée par Pauwels et col.

| | | |
|--|---|--|
| D.O. 540 des cellules infectées traitées | - | D.O. 540 des cellules infectées non traitées |
|--|---|--|

30

| | | |
|-------------------------------------|---|--|
| D.O. 540 des cellules non infectées | - | D.O. 540 des cellules infectées non traitées |
|-------------------------------------|---|--|

Les composés de l'invention présentent une activité anti VIH.

35

L'effet toxique des composés sur les cellules MT4 non infectées est mesuré par la même réaction colorimétrique. La dose cytotoxique 50 % (CD50) est la concentration de composé provoquant une diminution de moitié de la D.O. 540 par

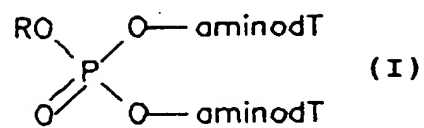
rapport à celle des cellules témoins.

rapport à celle des cellules témoins.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

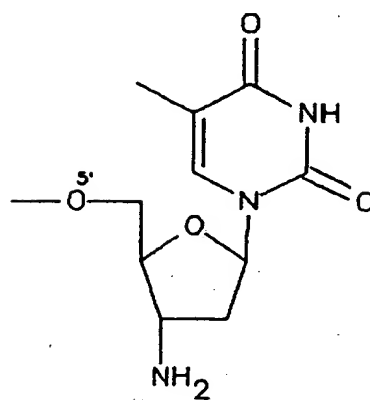
11

ANNEXE 1



-O-aminodT

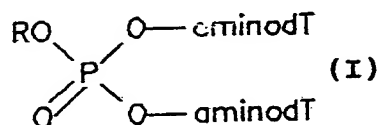
=



12
Revendications

1. Dérivés de 2',3'-didesoxy-3'-amino-thymidine répondant à la formule

5



dans laquelle

R est NH_4^+ ou $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_2^-$.

10

2. Médicament contenant un dérivé selon la revendication 1.

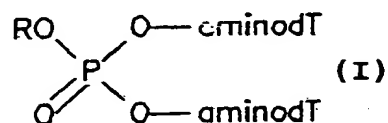
3. Composition pharmaceutique contenant un dérivé selon la revendication 1 en association avec tout excipient

15 pharmaceutique acceptable.

12
Revendications

1. Dérivés de 2',3'-didesoxy-3'-amino-thymidine répondant à la formule

5



dans laquelle

R est NH_4^+ ou $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_2^-$.

10

2. Médicament contenant un dérivé selon la revendication 1.

3. Composition pharmaceutique contenant un dérivé selon la revendication 1 en association avec tout excipient

15 pharmaceutique acceptable.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 92/01173

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5 C07H21/00; A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5 C07H ; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | FEBS LETTERS. Vol. 232, No. 1, 1988, AMSTERDAM NL pages 153 - 155 N.I.SOKOLOVA ET AL. ' Chemical Reactions within DNA Duplexes Cyanogen Bromide as an Effective Pligodeoxyribonucleotide Coupling Agent' *the whole document, especially p. 153, column 2, line 10, ACGGATnh2 | 1-3 |
| A | WO, A, 9 006 319 (SCHERING CORPORATION) 14 June 1990 see the whole document | 1-3 |
| A | EP, A, 0 284 405 (BAKER CUMMINS PHARMACEUTICALS INC) 28 September 1988 see the whole document | 1-3 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 March 1993 (09.03.93)

Date of mailing of the international search report

24 March 1993 (24.03.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9201173
SA 69100

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 09/03/93

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9006319 | 14-06-90 | AU-A- 4667189 | 26-06-90 |
| | | EP-A- 0375183 | 27-06-90 |
| EP-A-0284405 | 28-09-88 | AU-B- 604105 | 06-12-90 |
| | | AU-A- 1375888 | 29-09-88 |
| | | JP-A- 64003197 | 06-01-89 |

EPO FORM PCT/79

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9201173
SA 69100

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 09/03/93

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9006319 | 14-06-90 | AU-A- 4667189 | 26-06-90 |
| | | EP-A- 0375183 | 27-06-90 |
| EP-A-0284405 | 28-09-88 | AU-B- 604105 | 06-12-90 |
| | | AU-A- 1375888 | 29-09-88 |
| | | JP-A- 64003197 | 06-01-89 |

EPO FORM P007

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 92/01173

Demande internationale No

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB ⁸

CIB 5 C07H21/00; A61K31/70

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTEDocumentation minimale consultée⁹

| Système de classification | Symboles de classification |
|---------------------------|----------------------------|
| CIB 5 | C07H ; A61K |

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹**III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**¹⁰

| Catégorie ^o | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹² | No. des revendications visées ¹⁴ |
|------------------------|--|---|
| A | FEBS LETTERS. vol. 232, no. 1, 1988, AMSTERDAM NL pages 153 - 155 N.I.SOKOLOVA ET AL. 'Chemical Reactions within DNA Duplexes Cyanogen Bromide as an Effective Oligodeoxyribonucleotide Coupling Agent' *the whole document, especially p.153, column 2, line 10, ACGGATnh2 --- | 1-3 |
| A | WO,A,9 006 319 (SCHERING CORPORATION) 14 Juin 1990 voir le document en entier --- | 1-3 |
| A | EP,A,0 284 405 (BAKER CUMMINS PHARMACEUTICALS INC) 28 Septembre 1988 voir le document en entier ----- | 1-3 |

^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹^{"A"} document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent^{"E"} document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date^{"L"} document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)^{"O"} document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens^{"P"} document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée^{"T"} document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention^{"X"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive^{"Y"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.^{"&"} document qui fait partie de la même famille de brevets**IV. CERTIFICATION**

| | |
|---|--|
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 09 MARS 1993 | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 24. 03. 93 |
| Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS | Signature du fonctionnaire autorisé SCOTT J.R. |

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9201173
SA 69100

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

09/03/93

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO-A-9006319 | 14-06-90 | AU-A- 4667189 | 26-06-90 |
| | | EP-A- 0375183 | 27-06-90 |
| EP-A-0284405 | 28-09-88 | AU-B- 604105 | 06-12-90 |
| | | AU-A- 1375888 | 29-09-88 |
| | | JP-A- 64003197 | 06-01-89 |

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9201173
SA 69100

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

09/03/93

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO-A-9006319 | 14-06-90 | AU-A- 4667189 | 26-06-90 |
| | | EP-A- 0375183 | 27-06-90 |
| EP-A-0284405 | 28-09-88 | AU-B- 604105 | 06-12-90 |
| | | AU-A- 1375888 | 29-09-88 |
| | | JP-A- 64003197 | 06-01-89 |

EPO FORM P0072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)